

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงเชื้อรา Myceliophthora thermophila เพื่อให้ได้เซลล์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูง

ชื่อผู้เขียน นางสาว นวีวรรณ เบลี

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ. ดร. พูนสุข	ศิริโยธา	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ศิริรัตน์	สาระเวก	กรรมการ
ผศ. ดร. ปาน	พิมพ์ภา	กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการเลี้ยงเชื้อรา Myceliophthora thermophila เพื่อให้ผลิตเซลล์ที่เร่งปฏิกิริยาได้สูง โดยปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย รำข้าว 8 กรัม และฟางข้าว 2 กรัม ที่ผ่านการสลายด้วยสารเคมีต่าง ๆ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โซเดียมซัลไฟท์ (Na_2SO_3) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5-3% และเอทานอลเข้มข้น 25-95% พบว่าเชื้อที่เลี้ยงบนฟางข้าวที่สลายโดยต้มกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้ Carboxymethyl cellulase สูงสุด คือ สูงเป็น 1.76 เท่าของเซลล์ที่ได้จากเชื้อที่เลี้ยงบนฟางข้าวที่ไม่ผ่านการสลาย นอกจากนี้ยังได้ทำการปรับปรุงสภาวะของอากาศ โดยผ่านอากาศที่กรองด้วยสาลี่ลงในขวดเลี้ยงเชื้อ M. thermophila ด้วยอัตราเร็วต่ำ ช่วง 20-50 มล. ต่อนาที พบว่าเซลล์ที่ได้ต่ำกว่าเซลล์จากเชื้อราที่เลี้ยงในสภาวะที่ไม่ได้ผ่านอากาศ

เมื่อศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสลายเซลลูโลสธรรมชาติ พบว่าเอ็นไซม์ที่สกัดได้ นอกจากจะเร่งปฏิกิริยาสลาย Carboxymethyl cellulose ได้แล้ว ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาสลายรำข้าวและฟางข้าวได้อีกด้วย โดยเอ็นไซม์ที่ได้จากเชื้อราที่เลี้ยงในฟางข้าวที่ผ่านการสลายด้วย 3% NaOH สลายรำข้าว และฟางข้าวที่ผ่าน

การสลายด้วย 2 % NaOH ได้ดีที่สุด ให้ % Conversion เป็น 59.21 % และ 70.82 % ตามลำดับ ในเวลา 6 ชั่วโมง ในการเร่งสลายฟางข้าวที่ผ่านการสลายด้วย 2 % NaOH นั้น พบว่า ฟางนั้นถูกสลายได้ดีกว่าฟางขนาด 1.0 , 1.5 และ 2.0 ซม. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเร่งสลายฟางข้าวทุกชนิด คือ กลูโคส ส่วนเอ็นไซม์จากเชื้อราที่เลี้ยงในฟางข้าวที่ไม่ผ่านการสลาย สลายฟางข้าวที่ไม่ผ่านการสลายได้ดีที่สุด ให้ % Conversion เป็น 35.2 % ในเวลา 6 ชั่วโมง

เมื่อนำ Crude enzyme มาตกตะกอนด้วยอัมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-65 % พบว่า เอ็นไซม์ที่ได้ทุกเอ็นไซม์ สลายรำข้าวและฟางข้าวที่ไม่ผ่านการสลายด้วยสารเคมีน้อยกว่า Crude enzyme คือ ให้ % Conversion เพียง 12.6 - 16.9 % สำหรับรำข้าว และ 1.05 - 4.8 % สำหรับฟางข้าวที่ไม่ผ่านการสลาย ส่วนฟางข้าวที่ผ่านการสลายก่อนด้วย 2 % NaOH นั้น พบว่า % Conversion อยู่ในช่วง 51 - 66 % เมื่อตรวจสอบเอ็นไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอัมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเลี้ยงในฟางข้าวที่ไม่ผ่านการสลาย และที่ผ่านการสลายด้วย 3 % NaOH โดยวิธี Polyacrylamide disc gel electrophoresis พบแถบโปรตีน 4 แถบ ที่มีระยะทางเคลื่อนที่เท่ากัน และ SDS - polyacrylamide gel electrophoresis ให้โปรตีน 7 แถบ ซึ่งมีระยะทางเคลื่อนที่เท่ากันด้วย

Thesis Title Modification of Culture Conditions for the Production
of Highly Active Cellulase from Myceliophthora
thermophila

Author Ms. Chaweewan Paesee

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assoc. Prof. Dr. Poonsook Sriyotha Chairman

Assist.Prof. Dr. Sirirat Sarawek Member

Assist.Prof. Dr. Pan Pimpa Member

Abstract

Attempt was made to improve the culture conditions for Mycelioph-
thora thermophila so as to produce highly active cellulase. It was
found that cultivation of the fungus on a solid medium composing of
8 grammes of rice bran and 2 grammes of rice straw treated with So-
dium hydroxide (NaOH), Sodium sulphite (Na_2SO_3), Hydrochloric acid
(HCl) in the concentration range of 0.5-3% or 25-95% ethanol, gave
a better activity of the enzyme. Among them, rice straw treated with
3% HCl at 100 °C for 1 hour, was the most effective medium, giving
maximal activity of Carboxymethyl cellulase approximately 1.76 times
the activity obtained from untreated straw. Aeration of the culture
with sterile air at the rate of 20-50 mililiter per minute, gave
lower activity of Carboxymethyl cellulase than that from unaerated
culture.

In addition to hydrolysis of Carboxymethyl cellulose, all the enzymes so produced, could catalyze hydrolysis of rice bran and rice straw. The cellulase from culture medium containing rice straw treated with 3% NaOH was the best in carrying out such hydrolysis. Within the reaction time of six hours, the percentage of conversion was found to be 59.21% for rice bran and 70.82% for rice straw treated with 2% NaOH. In the case of untreated straw, the enzyme from the fungus cultured on the medium containing untreated straw was the best, giving 35.2% of conversion within 6 hours.

When the crude enzymes were treated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30-65 % saturation, the partially purified preparations were obtained, which, could catalyze the hydrolysis of rice bran and untreated rice straw with low percentage of conversion between 12.6-16.9% and 1.05-4.8% respectively, whereas with rice straw substrate treated with 2% NaOH, the conversion was 51-66% . Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the partially purified cellulase from the medium containing untreated rice straw or the rice straw treated with 3% NaOH revealed four protein bands, which, were resolved further to seven bands by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In both cases, all the protein bands moved over the same distances correspondingly.